

Terapia Fotodinâmica: Mecanismos e Aplicações

Renato Araújo Prates, Aécio Massayoshi Yamada Júnior,
Maria Cristina Eiko Hashimoto e Martha Simões Ribeiro

INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica (PDT, do inglês *Photodynamic Therapy*) é uma modalidade de fototerapia onde três fatores atuam concomitantemente. O fotossensibilizador (ou corante), uma fonte de luz e o oxigênio. Isoladamente, nem a droga nem a luz têm a capacidade de produzir o efeito deletério ao sistema biológico testado (1).

A PDT começou a ser empregada com sistemática científica em 1900, quando Oscar Raab descreveu que a combinação do corante acridina e luz exerciam um efeito letal sobre paramécios, demonstrando que este organismo unicelular podia morrer sob essas condições. A primeira aplicação na medicina é atribuída a Tappeiner e Jesionek em 1903, que utilizaram a aplicação tópica do corante eosina e exposição à luz para o tratamento de um câncer de pele. Desde então, vários estudos foram reportados na literatura, principalmente utilizando derivados de hematoporfirina como fotossensibilizador. Como resultado desses estudos, no final da década de 1960 Lipson obteve sucesso no tratamento de uma mulher portadora de câncer de mama usando hematoporfirina D e irradiando seletivamente o tumor, marcando assim o início da terapia fotodinâmica como terapia clínica para câncer (2, 3).

Em 1973, pesquisas investigaram a ação da terapia fotodinâmica na inativação do herpesvírus tipo-1 e mostraram que, em alguns casos, o curso das lesões foi interrompido (4).

A partir da década de 1970, várias preparações de derivados porfirínicos começaram a ser testadas para

uso na terapia fotodinâmica, culminando com o desenvolvimento do Photofrin® II (refinamento de hematoporfirina D) (3).

A terapia fotodinâmica em bactérias orais começou a ser investigada mais profundamente a partir da década de 1990, quando Dobson & Wilson demonstraram bons resultados em redução bacteriana utilizando o laser de He-Ne (Hélio-Neônio), $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ e $7,3 \text{ mW}$ de potência, associado aos fotossensibilizadores azul de toluidina (AT), azul de metileno (AM), ftalocianina e hematoporfirina. Foram testados *Streptococcus sanguis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis* recuperados do biofilme subgingival de pacientes com periodontite crônica. As amostras foram expostas à luz, na presença e na ausência dos corantes na concentração de $50 \mu\text{g/mL}$. Os autores concluíram que a combinação laser e corante alcançou uma significativa redução bacteriana. Entretanto, esta morte celular não foi significativa na presença apenas do corante ou apenas do laser. Os autores sugeriram que o laser em baixa intensidade associado a um corante apropriado poderia ser efetivo como tratamento coadjuvante ao debridamento mecânico em inflamações periodontais (5).

MECANISMO DE AÇÃO

Para que ocorram as reações fotoquímicas e fotofísicas que ocasionam morte celular, a molécula do fotossensibilizador deve absorver um fóton de luz, saindo do seu estado fundamental (S_0) para seu estado excitado

singleto (S_1). Neste momento, pode ocorrer perda de energia por processos de fluorescência (F) do estado S_1 para S_0 e/ou ocorrer o processo de cruzamento intersistema (CIS), levando a molécula para o estado excitado tripleto (T_1). A energia no estado T_1 pode ser dissipada pelo processo de fosforescência (Fs), devolvendo a molécula para o estado S_0 , e/ou transferir a energia para outras moléculas no meio (6) (Fig. 4.1).

Na reação do tipo I, ocorre a transferência de energia do fotossensibilizador excitado ao substrato, ocorrendo reações de óxido-redução com biomoléculas e produção das espécies reativas de oxigênio, como superóxido, radical hidroxila, etc. Na reação do tipo II, a molécula do fotossensibilizador encontra uma molécula de oxigênio e transfere sua energia para esta molécula, formando o estado excitado singleto do oxigênio. Este estado do oxigênio é quimicamente muito ativo e pode induzir várias reações em cadeia com componentes da célula, tais como DNA, proteínas, fosfolipídios da membrana celular, etc., tendo como resultado a morte da célula (7).

Por outro lado, a molécula de oxigênio no estado singleto pode perder sua energia por processos de emissão de fótons ou cruzamento intersistemas e voltar para seu estado fundamental sem começar qualquer reação. Então, a eficiência do processo fotodinâmico aumenta quando o rendimento quântico e o tempo de vida do estado tripleto do fotossensibilizador aumentam, bem como com o tempo de vida do estado singleto do oxigênio. Para aumentar a eficiência do processo, também pode ser aumentada a velocidade de reação do oxigênio singleto com certos reagentes, tais como DNA, proteínas ou membranas celulares. Isto acontece quando o oxigênio singleto é gerado perto deste

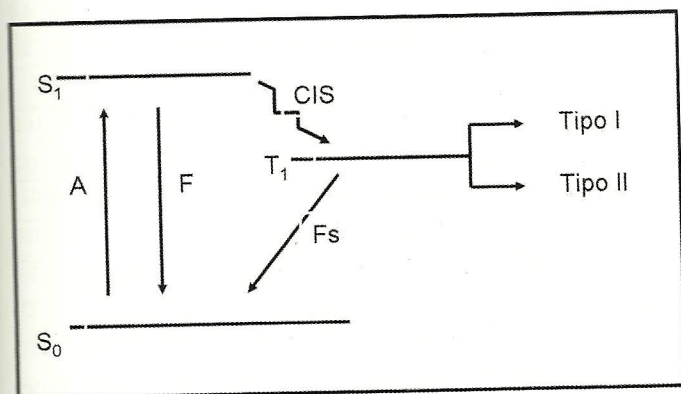


FIG. 4.1 Diagrama de Jablonski. Representação esquemática do sistema de trocas de energia na molécula do fotossensibilizador.

reagente, o que significa aumentar a probabilidade de encontro entre este reagente e o oxigênio singleto. Um caso especial é quando o sensibilizador que fornece sua energia para oxigênio já está ligado com este reagente. Portanto, mais um caminho para aumentar a eficiência do processo fotodinâmico é aumentar a afinidade do sensibilizador com as estruturas que devem ser destruídas (8).

TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA

O uso indiscriminado de agentes antimicrobianos promove a seleção natural de cepas bacterianas resistentes e deixa uma oportunidade para recombinação genética dos fatores de resistência e mutação. Isso pode ser interpretado como um dos maiores problemas para o século XXI, visto que a capacidade de adaptação destes seres é gigantesca e para cada medicamento colocado no mercado, em pouco tempo, surge uma cepa resistente (9-11). Dentro deste cenário, a terapia fotodinâmica antimicrobiana surge como uma modalidade terapêutica promissora, já que até o momento não existem evidências de resistência microbiana à PDT (12, 13).

A aplicação da PDT antimicrobiana tem sido proposta para tratar infecções localizadas superficiais, como as de ocorrência mais freqüente na pele e na cavidade oral. Porém, para utilização desta terapia de forma efetiva, alguns parâmetros devem ser estabelecidos, uma vez que variando a concentração e o tipo de fotossensibilizador, o tempo de pré-irradiação e os parâmetros de irradiação, resultados diferentes podem ser obtidos. Deve-se pensar também nas características morfológicas e bioquímicas dos microrganismos predominantes no sítio alvo, fatores genéticos celulares, seu estado fisiológico e concentração populacional, além das características do meio, como pH, concentração de água e conteúdo orgânico (14).

Ao longo dos anos, diferentes fontes de luz foram utilizadas, tais como lasers de argônio, hélio-neônio, de corantes, de vapores de metais e os lasers de diodo, normalmente utilizando-se comprimentos de onda próximos ao vermelho visível. No campo dos corantes, as pesquisas se concentraram nas porfirinas, corantes com estrutura química heterocíclica similar à clorofila e à hemoglobina. Nas últimas décadas, diversos autores se voltaram para o primeiro estudo de Raab, estudando a eliminação de

microrganismos pela terapia fotodinâmica, e para isso diversos corantes foram testados, como corantes azuis, roxos, marrons, verdes, entre outras cores complementares aos comprimentos de onda apresentados pelos lasers (15). Os estudos têm demonstrado que a utilização de corantes azuis, principalmente o AT e o AM, associada ao laser de He-Ne com comprimento de onda de aproximadamente 633 nm, apresenta os melhores resultados na redução microbiana de diversas culturas de bactérias (1, 16-18) e fungos *in vitro* (18, 19).

Entretanto, alguns trabalhos mostram que o tratamento com luz vermelha, ou azul, pode ser empregado como método terapêutico para inativar certas bactérias patogênicas que sintetizam porfirinas, que são cromóforos naturais, sem o uso de um fotossensibilizador externo (20, 21).

O importante na PDT é a capacidade de excitar o fotossensibilizador em seu alvo com mínimo efeito circunvizinho. Para isso, as células consideradas alvo da terapia acumulam seletivamente o fotossensibilizador e são irradiadas com luz localizada. A molécula do fotossensibilizador passará para um estado mais excitado e, voltando ao estado mais estável, transfere esta energia

para seu substrato, propiciando um efeito fotoquímico que leva à morte microbiana (19, 22-25).

Nesta terapia, as densidades de potência (intensidade ou taxa de fluência) utilizadas são baixas, aproximadamente da ordem de 1 W/cm². Vale ressaltar que esta terapia é não-térmica. Mantendo-se a mesma dose (densidade de energia ou fluência), porém variando-se a intensidade ou taxa de fluência ou o tempo de exposição, podem-se obter diferentes resultados, e os efeitos também são dependentes da concentração do fotossensibilizador e do tempo de pré-irradiação, como dito anteriormente. A eficiência desta terapia, portanto, é dependente de fatores biológicos, como a seletividade e a retenção do fotossensibilizador, bem como a concentração de oxigênio no meio; fatores físicos, como a intensidade ou taxa de fluência da luz que chega à região de tratamento e a eficiência na absorção dos fótons e na transferência de energia de excitação do fotossensibilizador; e químicos, como o tempo de vida da molécula no estado tripleto e efeito oxidante na molécula.

As Tabelas 4.1 e 4.2 resumem alguns trabalhos da literatura que utilizaram diferentes fotossensibilizadores, com diferentes fontes de luz, para obtenção de morte microbiana através da terapia fotodinâmica.

TABELA 4.1 Alguns estudos *in vitro* em terapia fotodinâmica antimicrobiana com interesse odontológico

Estudo	Fotossensibilizador	Fonte de luz (em nm)	Microrganismo
Dobson and Wilson (1992)	AT, AM, ftalocianina	Laser 633	Diferentes cepas
Wilson <i>et al.</i> (1996)	Ftalocianina	LED 660	<i>S. sanguinis</i>
Wood <i>et al.</i> (1999)	Ftalocianina	Luz branca	Diferentes cepas
Haas <i>et al.</i> (1997)	AT	LED 905	<i>Periodontopatógenos</i>
Seal <i>et al.</i> (2002)	AT	Laser 633	<i>Streptococcus intermedius</i>
Soukos <i>et al.</i> (2003)	Clorina	Luz vermelha	<i>Actinomyces naeslundii</i>
Lee <i>et al.</i> (2004)	Protoporfirina IX	LED 630	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Metcalf <i>et al.</i> (2006)	Eritrosina	Luz branca	<i>S. mutans</i>
Hope and Wilson (2006)	Clorina	Laser 488 Laser 543	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Wood <i>et al.</i> (2006)	Eritrosina, AM, Photofrin®	Luz branca	<i>S. mutans</i>
Williams <i>et al.</i> (2006)	AT	LED 633	<i>Streptococcus intermedius</i>
Zanin <i>et al.</i> (2006)	AT	LED 633	<i>S. mutans</i> , <i>S. sanguinis</i> , <i>S. sobrinus</i>
Souza <i>et al.</i> (2006)	AM	Laser 68	<i>Candida</i> sp.
Soukos <i>et al.</i> (2006)	AM	LED 665	<i>Enterococcus faecalis</i>
Prates <i>et al.</i> (2007)	Verde de malaquita	Laser 660	<i>A. actinomycetemcomitans</i>
Donnelly <i>et al.</i> (2007)	AT	635 lâmpada	<i>C. albicans</i>
Garcez <i>et al.</i> (2007)	Clorina	660 Laser	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>P. aeruginosa</i>

TABELA 4.2 Estudos *in vivo* em PDT antimicrobiana

Estudo	Fotossensibilizador	Fonte de luz (em nm)	Doença/modelo
Haas <i>et al.</i> (2000)	AT	Laser 905	periimplantite/pacientes
Dortbudak <i>et al.</i> (2001)	AT	Laser 690	periimplantite/pacientes
Teichert <i>et al.</i> (2002)	AM	Laser 664	candidose/camundongo
Kömerink <i>et al.</i> (2003)	AT	Laser 630	periodontite/rato
Sibli <i>et al.</i> (2003)	AT	Laser 685	periimplantite/cachorro
Hayek <i>et al.</i> (2005)	azuleno	Laser 660	periimplantite/cachorro
Sigusch <i>et al.</i> (2005)	clorina	Laser 662	gingivite/cachorro
Bonsor <i>et al.</i> (2006)	AT	Laser de emissão vermelha	pulpite ou periodontite perirradicular/ paciente
Almeida <i>et al.</i> (2007)	AM	Laser 685	periodontite/rato
Oliveira <i>et al.</i> (2007)	HELBO®	Laser 660	periodontite/pacientes

TERAPIA FOTODINÂMICA NA ODONTOLOGIA

Uma grande vantagem da terapia fotodinâmica é a ação local e restrita do tratamento, assegurando manutenção na ecologia entérica, que normalmente é muito afetada pelos antibióticos, e a microbiota de vários sítios na cavidade oral, que também não são afetados pelo tratamento local.

Periodontia

Durante o tratamento básico, após os procedimentos raspagem e alisamento radicular, pode-se usar a PDT para reduzir a carga microbiana nas bolsas periodontais, melhorando assim a regeneração destes sítios, através da ação antimicrobiana desta técnica e da capacidade de cicatrizar a parede gengival e radicular da bolsa.

Após o tratamento periodontal básico, deve-se aguardar 30 dias para a reavaliação do paciente, e, neste novo momento, decide-se pela correção cirúrgica das bolsas persistentes ou pela indicação do paciente para o sistema de controle e manutenção da doença. No caso de permanecerem bolsas residuais, com profundidade de sondagem superior a 5 mm, pode-se utilizar a PDT como alternativa e conseguir uma nova inserção das fibras ópticas na raiz dental, evitando assim que o paciente necessite de um procedimento cirúrgico.

Durante as cirurgias de raspagem em campo aberto, pode-se utilizar a PDT como uma desinfecção eficiente

dos tecidos gengivais, sobretudo em regiões de furca e outras áreas de difícil acesso na raiz dos dentes. Nos pacientes em manutenção, a PDT também pode ser usada nos casos de recidiva de bolsas periodontais.

CASO CLÍNICO

Paciente portadora de periodontite crônica em fase de reavaliação, 30 dias após o tratamento básico ainda apresentando bolsas periodontais persistentes (Figs. 4.2a-d). Foi proposta a utilização da terapia fotodinâmica utilizando como fotossensibilizador o azul de metileno a 0,01% (Fig. 4.3a) associado ao equipamento laser (UNIT KONDORTECH, São Carlos Brasil), em $\lambda = 660$ nm e 30 mW de potência, usando uma densidade de energia de 5,2 J/cm² (Fig. 4.3b).

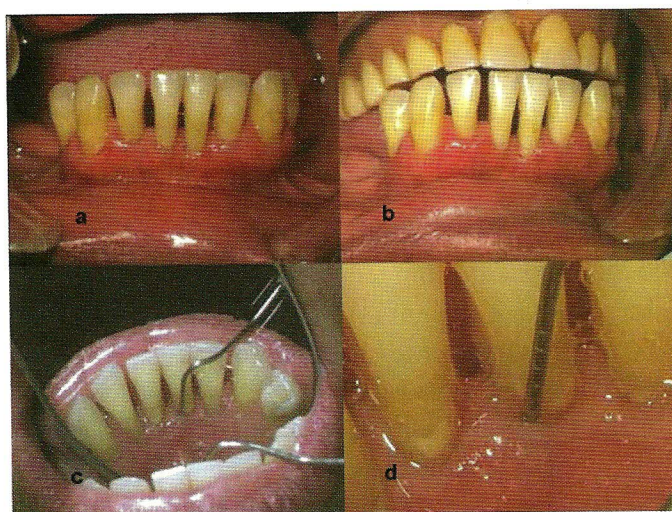


FIG. 4.2

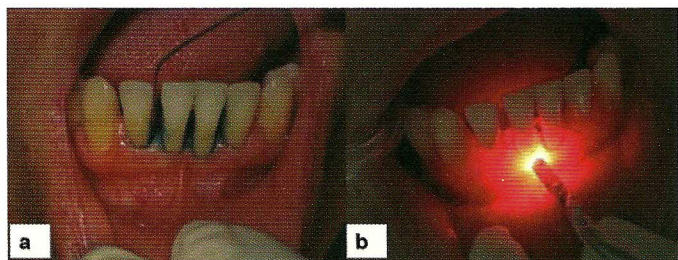


FIG. 4.3

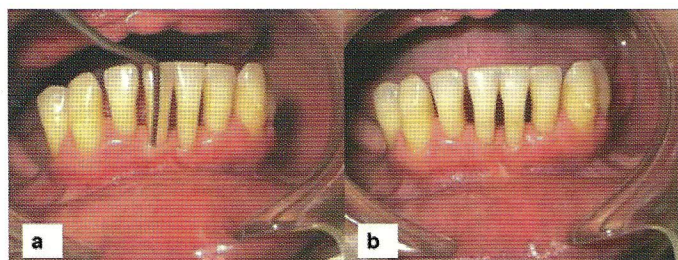


FIG. 4.4

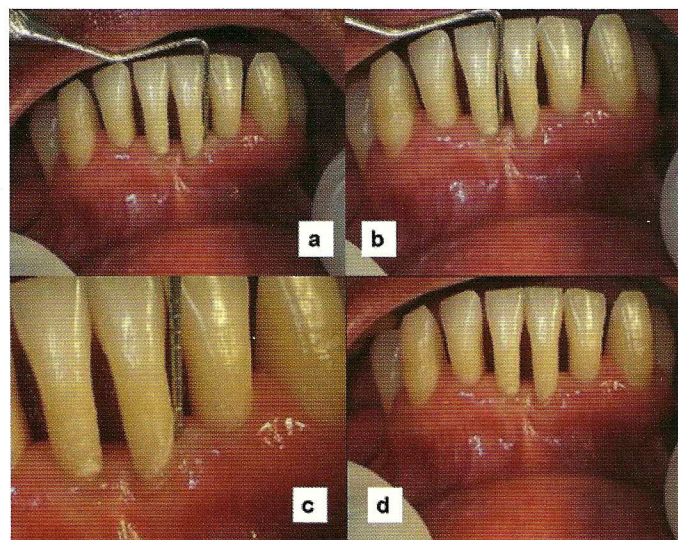


FIG. 4.5

A Fig. 4.3 ilustra a irrigação da bolsa com o fotosensibilizador e a irradiação após o tempo de pré-irradiação de 5 minutos.

As Figs. 4.4a e b mostram o aspecto clínico após 15 dias do tratamento com terapia fotodinâmica, apresentando completa melhora no quadro inflamatório dos tecidos periodontais e redução da profundidade de sondagem de 7 mm para 3 mm.

A Fig. 4.5 mostra o aspecto clínico após 6 meses do tratamento, durante a segunda consulta de manutenção da terapia periodontal de suporte. Observam-se a ausência de bolsas periodontais e manutenção da saúde no tecido gengival.

Endodontia

Sabe-se que uma das causas de insucesso no tratamento endodôntico são infecções residuais no interior dos canais radiculares devido a bactérias remanescentes após tratamento endodôntico (26, 27). A maioria das soluções desinfetantes utilizadas clinicamente, tais como hipoclorito de sódio, clorexidina, EDTA, ácido cítrico, peróxido de hidrogênio, halogênicos e ozônio, são utilizadas em concentrações onde a toxicidade é um fator significativo, podendo causar reações adversas nos tecidos (28, 29). Antibióticos podem causar problemas de resistência bacteriana, e mesmo os de largo espectro não são efetivos contra todas as espécies bacterianas que habitam o canal radicular (30). Tais problemas necessitam ser evitados, e a terapia fotodinâmica poderá ser uma nova alternativa.

Em recente estudo, bactérias como *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella intermedia* e *Streptococcus intermedius*, que costumam colonizar o interior de canais radiculares, foram submetidas à terapia fotodinâmica e apresentaram redução significativa quando comparadas ao controle (31).

Outro estudo experimental com biofilmes de *Enterococcus faecalis* concluiu que a terapia fotodinâmica pode ser um procedimento coadjuvante na eliminação de bactérias residuais no interior de canais radiculares após tratamento endodôntico padrão (32).

Dentística

Segundo dados da OMS (Organização Mundial de Saúde), a doença cárie e as periodontopatias estão entre as doenças mais prevalentes do ser humano, atingindo 60 a 90% de crianças em idade escolar, e adultos de todas as idades, grupos étnicos e classes sociais (33). O Brasil faz parte do grupo de países com as 10 maiores prevalências de cárie do mundo (34).

Etiologicamente, a cárie representa uma complexa interação entre a microbiota oral, dieta, dentição e ambiente oral (35), porém, a presença de bactérias cariogênicas é crucial para o início e progressão da lesão de cárie. Elas se comportam como uma comunidade bacteriana chamada placa dental, que reflete um típico exemplo de biofilme microbiano (36).

A prevenção primária (prevenção de cárie) e o controle da doença (prevenção secundária) focam princi-

palmente a redução do biofilme, através de meios mecânicos ou químicos (37).

Agentes quimioterápicos e quimioprofiláticos empregados na prevenção de cáries possuem composição química simples e são de fácil utilização, porém existem casos onde a remoção mecânica do biofilme torna-se difícil (por exemplo, ao redor de braquetes ortodônticos e fissuras), e o agente químico não consegue agir durante o tempo considerado adequado.

A terapia fotodinâmica, inicialmente utilizada para o tratamento de tumores, pode ser uma alternativa para a redução de microrganismos cariogênicos, tanto aqueles presentes em biofilmes, atuando de forma preventiva, ou através da eliminação de bactérias *in situ*, minimizando dessa forma a quantidade de tecido sadio a ser removido durante o preparo cavitário convencional.

Alguns trabalhos demonstraram o potencial bactericida desta modalidade de terapia, utilizando lasers em baixa intensidade (38-40) e outras fontes de luz alternativas (41).

Alguns estudos têm demonstrado resultados efetivos mesmo quando as bactérias se encontram sob a forma de biofilmes, como ocorre na placa subgingival (40, 42, 43) ou mesmo quando as bactérias estão embebidas em matriz de colágeno e sob dentina desmineralizada (25).

REFERÊNCIAS

- Prates RA, Yamada Jr. AM, Suzuki LC, Eiko Hashimoto MC, Cai S, Gouw-Soares S, *et al.* Bactericidal effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Photochem Photobiol B* 2007; 86(1):70-6.
- Raab O. On the effect of fluorescent substances on infusoria. *Z Biol* 1900; 39:524.
- Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 2001; 74(5):656-69.
- Felber TD, Smith EB, Knox JM, Wallis C, Melnick JL. Photodynamic inactivation of herpes-simplex – Report of a clinical trial. *Jama—Journal of the American Medical Association* 1973; 223(3):289-292.
- Wilson M, Dobson J, Sarkar S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. *Oral Microbiology and Immunology* 1993; 8(3):182-187.
- Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, *et al.* Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90(12):889-905.
- Konan YN, Gurny R, Allemann E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 2002; 66(2):89-106.
- Redmond RW, Kochevar IE. Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen. *Photochem Photobiol* 2006; 82(5):1178-86.
- Nishihara T, Koseki T. Microbial etiology of periodontitis. *Periodontol* 2000 2004; 36:14-26.
- Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000 2002; 28:12-55.
- Slots J, Jorgensen MG. Effective, safe, practical and affordable periodontal antimicrobial therapy: where are we going, and are we there yet? *Periodontol* 2000 2002; 28:298-312.
- Griffiths MA, Wren BW, Wilson M. Killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro using aluminium disulphonated phthalocyanine, a light-activated antimicrobial agent. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40(6):873-6.
- Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci* 2004; 3(5):436-50.
- Núñez SC. Estudo da dinâmica de fotodegradação e agregação das fenotiazinas azul de metileno e azul de orto-toluidina com relação à eficiência fotodinâmica. São Paulo: IPEN-CNEN; 2007.
- Kawamoto K, Senda N, Shimada K, Ito K, Hirano Y, Murai S. Antibacterial effect of yellow He-Ne laser irradiation with crystal violet solution on *Porphyromonas gingivalis*: An evaluation using experimental rat model involving subcutaneous abscess. *Lasers in Medical Science* 2000; 15(4):257-262.
- Zanin IC, Gonçalves RB, Junior AB, Hope CK, Pratten J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56(2):324-30.
- Pfützner A, Sigusch BW, Albrecht V, Glockmann E. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *J Periodontol* 2004; 75(10):1343-9.
- Demidova TN, Hamblin MR. Photodynamic therapy targeted to pathogens. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2004; 17(3):245-54.
- de Souza SC, Junqueira JC, Balducci I, Koga-Ito CY, Munin E, Jorge AO. Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. *J Photochem Photobiol B* 2006; 83(1):34-8.
- Henry CA, Dyer B, Wagner M, Judy M, Matthews JL. Phototoxicity of argon laser irradiation on biofilms of *Porphyromonas* and *Prevotella* species. *J Photochem Photobiol B* 1996; 34(2-3):123-8.
- Papageorgiou P, Katsambas A, Chu A. Phototherapy with blue (415 nm) and red (660 nm) light in the treatment of acne vulgaris. *Br J Dermatol* 2000; 142(5):973-978.
- Chan Y, Lai CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 2003; 18(1):51-5.
- Komerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(3):932-40.

24. Millson CE, Wilson M, MacRobert AJ, Bown SG. Ex-vivo treatment of gastric Helicobacter infection by photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 1996; 32(1-2):59-65.
25. Wilson M, Burns T, Pratten J, Pearson GJ. Bacteria in supra-gingival plaque samples can be killed by low-power laser-light in the presence of a photosensitizer. *Journal of Applied Bacteriology* 1995; 78(5):569-574.
26. Sjogren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1997; 30(5):297-306.
27. Hancock HH, 3rd, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91(5):579-86.
28. Spangberg L, Langeland K. Biologic effects of dental materials. 1. Toxicity of root canal filling materials on HeLa cells in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1973; 35(3):402-14.
29. Yesilsoy C, Whitaker E, Cleveland D, Phillips E, Trope M. Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. *J Endod* 1995; 21(10):513-5.
30. EAM Kidd SJ-B. Prevention of caries by plaque control. In: Ltd IP, editor. *Essentials of dental caries: The disease and its management*. 1 ed. Bristol; 1987. p. 134-135.
31. Williams JA, Pearson GJ, Colles MJ. Antibacterial action of photoactivated disinfection {PAD} used on endodontic bacteria in planktonic suspension and in artificial and human root canals. *J Dent* 2006; 34(6):363-71.
32. Soukos NS, Chen PS, Morris JT, Ruggiero K, Abernethy AD, Som S, *et al.* Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *J Endod* 2006; 32(10):979-84.
33. Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century – the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol* 2003; 31 Suppl 1:3-23.
34. Medeiros U. Controle clínico da doença cárie. In: Santos, editor. *Dentística Restauradora – O essencial para o clínico*. 1 ed; 1998. p. 7-19.
35. Marsh PD. Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. *Dent Clin North Am* 1999; 43(4):599-614, v-vi.
36. Marsh PD, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol* 1995; 15(3):169-75.
37. Banerjee A, Watson TF, Kidd EA. Dentine caries excavation: a review of current clinical techniques. *Br Dent J* 2000; 188(9):476-82.
38. Venezia FR, DiVincenzo C, Sherman R, Reichman M, Origitano TC, Thompson K, *et al.* Bactericidal effects of photoradiation therapy with hematoporphyrin derivative. *J Infect Dis* 1985; 151(1):166-9.
39. Walsh LJ. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 2. Hard tissue applications. *Aust Dent J* 1997; 42(5):302-6.
40. Seal GJ, Ng YL, Spratt D, Bhatti M, Gulabivala K. An in vitro comparison of the bactericidal efficacy of lethal photosensitization or sodium hypochlorite irrigation on *Streptococcus intermedius* biofilms in root canals. *Int Endod J* 2002; 35(3):268-74.
41. Hashimoto MCE. Redução bacteriana com diodo emissor de luz azul associado ao fotossensibilizador rodamina ácida B: Estudo in vitro sobre *Streptococcus mutans*. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2005.
42. Wilson M, Dobson J, Harvey W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. *Curr Microbiol* 1992; 25(2):77-81.
43. Burns T, Wilson M, Pearson GJ. Sensitization of cariogenic bacteria to killing by light from a helium-neon laser. *Journal of Medical Microbiology* 1993; 38(6):401-405.